

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
5. April 2001 (05.04.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/23005 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61K 49/00 //
C07K 16/18

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/08121

(22) Internationales Anmeldedatum:
19. August 2000 (19.08.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 47 559.8 24. September 1999 (24.09.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT
[DE/DE]; Müllerstr. 178, 13342 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHIRNER, Michael
[DE/DE]; Birkenallee 12, D-13158 Berlin (DE). LICHKA,
Kai [DE/DE]; Bornimer Str. 17A, D-14612 Falkensee
(DE). DINKELBORG, Ludger [DE/DE]; Ortwinstr. 7,
D-13465 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,
CZ, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eura-
sisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— Mit internationalem Recherchenbericht.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: ANTIBODY DYE CONJUGATES FOR BINDING TO TARGET STRUCTURES OF ANGIOGENESIS IN ORDER
TO INTRAOPERATIVELY DEPICT TUMOR PERIPHERIES

(54) Bezeichnung: ANTIKÖRPER-FARBSTOFFKONJUGATE GEGEN ZIELSTRUKTUREN DER ANGIOGENESE ZUR IN-
TRAOPERATIVEN TUMORRANDDARSTELLUNG

(57) Abstract: The invention relates to antibody dye conjugates which are suited for binding to structures of newly formed vessels
and to their use for intraoperatively depicting pathological angiogenesis.

(57) Zusammenfassung: Es werden Antikörper-Farbstoffkonjugate, die geeignet sind an Strukturen neugebildeter Gefäße zu bin-
den und deren Verwendung zur intraoperativen Darstellung der pathologischen Angiogenese beschrieben.

WO 01/23005 A1

Antikörper-Farbstoffkonjugate gegen Zielstrukturen der Angiogenese zur intraoperativen Tumorranddarstellung

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft Antikörper-Farbstoffkonjugate, die geeignet sind an Strukturen neugebildeter Gefäße zu binden und deren Verwendung zur intraoperativen Darstellung der pathologischen Angiogenese.

10 Im erwachsenen Organismus findet bis auf wenige Ausnahmen (z. B. der Zyklus der gebärfähigen Frau) keine Neubildung von Gefäßen statt. Die Neubildung von Gefäßen ist jedoch bei vielen Erkrankungen zu beobachten. Der hier stattfindende Prozeß der Gefäßneubildung wird als Angiogenese bezeichnet und findet als Antwort auf bestimmte Signale statt.

- 15 Die Angiogenese ist ein Prozeß, der im Randbereich eines Krankheitsherd bevorzugt stattfindet. Aus dem Zentrum des Krankheitsherd werden Faktoren freigesetzt, die zum Randbereich des Krankheitsherd diffundieren. Diese Faktoren werden auch als Angiogenesestimulatoren bezeichnet. Erreichen diese Angiogenesestimulatoren das gesunde Gewebe im Randbereich eines
- 20 Krankheitsherd, werden bisher nicht in den Krankheitsherd einbezogene Gefäße stimuliert, neue Gefäßknospen zu bilden. Die von diesen Gefäßknospen auswachsenden Gefäße bilden ein neues Kapillargefäßnetz im Randbereich des Krankheitsherd. Durch diesen Prozeß kann immer eine adäquate Nährstoffversorgung für den Krankheitsherd sichergestellt werden. Als
- 25 besonders wichtig hat sich herausgestellt, daß das Wachstum von Tumoren und deren Metastasen von der Fähigkeit abhängt, die Angiogenese zu induzieren.

Die chirurgische Therapie ist heute eine Standardmaßnahme zur Behandlung von lokalisierten Krankheitsherden. Große Bedeutung hat sie bei der

30 Tumorbehandlung erlangt. Es hat sich aber herausgestellt, daß trotz verbesserter chirurgischer Techniken die Zahl der lokalen Rezidive beträchtlich ist, da die anatomischen Gegebenheiten im menschlichen Organismus nur selten eine großräumige Entfernung der Krankheitsherde zulassen. In vielen

Organen (z. B. im Gehirn) muß auf ein großräumiges Entfernen verzichtet werden, um gesundes Gewebe zu erhalten. Das Risiko der Verletzung gesunder Organe steigt mit der Radikalität des chirurgischen Eingriffs.

- 5 Histologische Untersuchungen des Tumorrandbereiches nach erfolgter chirurgischer Tumorentfernung haben jedoch gezeigt, daß eine Vielzahl von Tumoren nicht vollständig entfernt werden können und Tumorreste im Körper verbleiben. Von diesen Tumorresten kann weiteres Tumorwachstum und auch die Tumormetastasierung ausgehen. Ein Verfahren, daß die Grenzen eines
- 10 Krankheitsprozesses zum gesunden Gewebe während der chirurgischen Behandlung exakt darstellt, würde es erlauben, Krankheitsherde vollständig zu entfernen und das gesunde Gewebe weitgehend zu schonen.

- Farbstoffe zur Darstellung von Krankheitsherden sind bereits bekannt (Poon WS et al., J Neurosurgery (1992) 76: 679-686, Haglund MM et al., Neurosurgery (1996) 38: 308-317). Sie werden vorzugsweise von Tumorzellen direkt
- 15 aufgenommen oder reichern sich unspezifisch im extrazellulären Raum der Tumoren an. Da der Mechanismus der Anreicherung auch im gesunden Gewebe nachweisbar ist, ist die Spezifität und Empfindlichkeit der verwendeten
- 20 Substanzen gering.

- Verbindungen, die für die intraoperative Abgrenzung der Krankheitsherde durch selektive Darstellung des Randbereiches eines Krankheitsherdes verwendet werden können, sind bisher nicht bekannt.

25

- Die Angiogenese findet im Randbereich von Krankheitsherden bevorzugt statt. Durch Darstellung der Angiogenese kann die Grenze zum gesunden Gewebe dargestellt werden. Antikörper zum Nachweis der Angiogenese im Krankheitsherd sind bereits bekannt und werden zur Darstellung von
- 30 neugebildeten Gefäßen im histologischen Gewebeschnitt, zum Nachweis verschiedener Proteine im Krankheitsherd oder als Trägermoleküle für therapeutische Substanzen verwendet.

Nicht bekannt sind jedoch Antikörper in Kombination mit Farbstoffen, sogenannte Antikörper-Farbstoffkonjugate, die für die intraoperative Abgrenzung der Krankheitsherde durch selektive Darstellung des Randbereichs eines Krankheitsherdes zum Einsatz kommen können.

- 5 Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, Antikörper-Farbstoffkonjugate für die intraoperative Tumorrandardarstellung bereitzustellen. Die Antikörper der erfindungsgemäßen Antikörper-Farbstoffkonjugate sind gegen Strukturen gerichtet, die spezifisch für den Prozeß der Angiogenese sind. Die erfindungsgemäßen Antikörper-Farbstoffkonjugate umfassen Farbstoffe, die
- 10 durch ihre Anreicherung eine optisch Darzustellen ermöglichen. Da die Angiogenese im Randbereich eines Krankheitsherdes am stärksten ausgebildet ist, kommt es hier zum größten optischen Signal. Die erfindungsgemäßen Antikörper-Farbstoffkonjugate sind somit geeignet, die Grenze eines Krankheitsherdes, den sogenannten Randbereich, zum gesunden
- 15 Gewebe durch intraoperative, optische Diagnostik darzustellen. Hierdurch wird es ermöglicht, den Krankheitsherd bei weitgehender Schonung des gesunden Gewebes vollständig zu entfernen.

- Es sind Antikörper bekannt, die gegen Moleküle gerichtet sind, die im
- 20 angiogenetisch aktiven Gewebe stark exprimiert und im angrenzenden Gewebe nur auf sehr geringem Niveau exprimiert sind (WO 96/01653).

- Von besonderem Interesse in den Antikörper-Farbstoffkonjugaten sind Antikörper, die gegen die Rezeptoren für vaskuläre Wachstumsfaktoren
- 25 gerichtet sind, Rezeptoren auf Endothelzellen, an die Entzündungsmediatoren binden, Rezeptoren auf Endothelzellen, an die Matrixmoleküle binden und Matrixproteine, die spezifisch bei der Gefäßneubildung exprimiert werden (Brekken et al., Cancer Res. (1998) 58: 1952-9 und Schold SC Jr et al., Invest. Radiol. (1993) 28: 488-96).

30

Bevorzugt sind Antikörper oder Antikörperfragmente, die gegen das Matrixprotein EDB-Fibronectin gerichtet sind. EDB-Fibronectin (EDBFN), auch als onkofetales Fibronectin bekannt, ist eine Splicevariante des Fibronectins,

-4-

das sich spezifisch um neugebildete Gefäße im Prozeß der Angiogenese bildet. Der besondere Vorteil von Antikörpern gegen das EDB-Fibronectin besteht darin, daß es durch intraoperative Verwundung bei der Entfernung des Krankheitsherdes zu keiner Neubildung des EDB-Fibronectins im gesunden Gewebe kommt. Hierdurch bleibt die Spezifität während des chirurgischen Eingriffs erhalten. Antikörper gegen Wachstumsfaktorrezeptoren oder Entzündungsmediatoren auf der Endothelzelle, die ebenfalls spezifisch im Tumorrandbereich exprimiert werden, können aber während des chirurgischen Eingriffs auch im gesunden Gewebe in der Nähe des Krankheitsherdes neugebildet werden.

Besonders bevorzugt im erfinderischen Antikörper-Farbstoffkonjugat sind die Antikörper L19 und E8 gegen das EDB-Fibronectin (Viti F et al, Cancer Res (1999) 59: 347-352).

Solche Antikörper-Farbstoffkonjugate sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Die bekannten Antikörper werden mit Farbstoffen konjugiert, deren Anreicherung im Gewebe optisch detektiert werden kann und die intraoperativen Abgrenzung des Randbezirkes eines Krankheitsherdes ermöglicht.

Der Vorteil der erfindungsgemäßen Antikörper-Farbstoffkonjugate besteht nun darin, daß diese für eine selektive Fluoreszenzanfärbung von Geweben in neoangiogenetischem Stadium zur Anwendung kommen können. Die Fluoreszenzanfärbung ist tumorspezifisch und liefert ein Fluoreszenzsignal, daß in hohem Signal-zu-Untergrund-Verhältnis detektiert werden kann.

Es sind auch Antikörper-Farbstoffkonjugate für die Fluoreszenzbildgebung zum Zwecke der perkutanen, nicht-invasiven Tumordarstellung bekannt (Neri D et al., Nature Biotechnology (1997) 15: 1271-1275).

Nicht bekannt jedoch sind Antikörper-Farbstoffkonjugate, die sich im Randbereich eines Krankheitsherdes bevorzugt anreichern.

unter Verwendung eines definierten Wellenlängenbereiches des sichtbaren oder nahinfraroten Lichtes ein Fluoreszenzsignal induziert.

- Antikörper-Farbstoffkonjugate umfassend Farbstoffe mit visuell erfaßbarer
- 5 Fluoreszenz, sind beispielsweise solche aus folgenden Klassen:
Fluorescein, Fluorescein-isothiocyanat, Carboxyfluorescein oder Calcein,
Tetrabromfluoresceine oder Eosine, Tetraiodfluoresceine oder Erythrosine,
Difluorfluorescein, wie z. B. Oregon GreenTM 488, Oregon GreenTM 500 oder
Oregon GreenTM 514, Carboxyrhodol (Rhodol GreenTM)-Farbstoffe (US
10 5,227,487; US 5,442,045), Carboxyrhodamin-Farbstoffe (z. B. Rhodamine
GreenTM Dyes) (US 5,366,860),
4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-indacene, wie z. B. Bodipy FL, Bodipy 493/503
oder Bodipy 530/550 und Derivate davon (US 4,774,339, US 5,187,288, US
5,248,782, US 5,433,896, US 5,451,663),
- 15 Cyaninfarbstoffe, insbesondere Carbocyanine und Merocyanine,
Coumarinfarbstoffe, wie z. B. 7-Amino-4-methylcoumarin, Metallkomplexe von
DTPA oder Tetraaza-macrozyklen (Cyclen, Pycen) mit Terbium oder Europium
oder Tetrapyrrolfarbstoffe, insbesondere Porphyrine.
- 20 Antikörper-Farbstoffkonjugate umfassend Nahinfrarotfarbstoffe, sind
beispielsweise solche aus folgenden Klassen:
Polymethinfarbstoffe, wie Dicarbocyanin-, Tricarbocyanin-, Merocyanin- und
Oxonolfarbstoffe (WO 96/ 17628),
Rhodaminfarbstoffe,
- 25 Phenoxazin- oder Phenothiazinfarbstoffe,
Tetrapyrrolfarbstoffe, insbesondere Benzoporphyrine, Chlorine und
Phthalocyanine.
- Bevorzugte Nahinfrarotfarbstoffe in den Antikörper-Farbstoffkonjugaten sind die
Cyaninfarbstoffe mit Absorptionsmaxima zwischen 700 und 800 nm,
30 insbesondere Indodi- und Indotricarbocyanine.

Generell bevorzugt sind Farbstoffe in den Antikörper-Farbstoffkonjugaten aus o.
g. Klassen, die eine oder mehrere Carboxylgruppen besitzen, welche nach

-8-

chemischer Aktivierung an Aminogruppen von Antikörpern oder Antikörperfragmenten gekoppelt werden. Auch sind solche Derivate bevorzugt, die Maleimido- oder Bromalkylreste enthalten, so daß eine kovalente Kopplung an die Sulfhydrylgruppe der Aminosäure Cystein erfolgt.

- 5 Weiterhin sind Farbstoffe bevorzugt, die Isothiocyanat-Gruppen besitzen, welche ebenfalls mit Aminogruppen reagieren.

Darüber hinaus müssen die Farbstoffe in den Antikörper-Farbstoffkonjugaten eine hohe Photostabilität besitzen und unter Bestrahlung mit Licht nicht ausbleichen (Photobleaching), um innerhalb des Untersuchungszeitraums ein
10 konstantes Signal zu gewährleisten.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind somit Antikörper-Farbstoffkonjugate, die sich im Randbereich des Zellgewebes eines Krankheitsherdens bevorzugt anreichern und damit den Randbereich des
15 Krankheitsherdens optisch darstellbar machen.

Insbesondere Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Antikörper-Farbstoffkonjugate der allgemeinen Formel I

20
$$B-(F)_n \quad (I),$$

in der

B für einen Antikörper oder ein Antikörperfragment mit hoher Bindung an ED-BFN steht,

F für einen Farbstoff aus der Klasse der Coumarine, der Fluoresceine,
25 Carboxyfluoresceine, der Difluorfluoresceine, der Tetrabromfluoresceine, der Tetraiodfluoresceine, der Rhodamine, der Carboxyrhodamine, der Carboxyrhodole, der 4,4-Difluoro-4-bora-3a, 4a-diaza-indacene, der Polymethinfarbstoffe oder der Tetrapyrrolfarbstoffe, oder der Terbium- oder Europiumkomplexe mit DTPA oder Cyclen und
30 dessen Derivaten steht
und
n für 1 bis 5 steht, bedeuten.

-9-

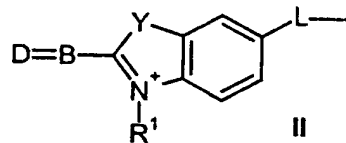
Besonders bevorzugt und damit ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Antikörper-Farbstoffkonjugate, deren Farbstoff ein Cyaninfarbstoff, ein Merocyaninfarbstoff, ein Oxonolfarbstoff, ein Styrylfarbstoff oder ein Squariliumfarbstoff ist.

5

Insbesondere bevorzugt und damit ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Antikörper-Farbstoffkonjugate, in denen der Farbstoffanteil ein Cyaninfarbstoff, insbesondere ein Carbocyanin, Dicarbocyanin oder Tricarbocyanin ist.

10

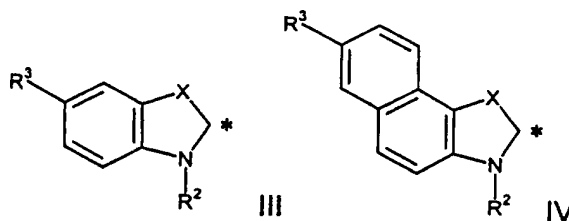
Die Erfindung betrifft somit insbesondere solche Antikörper-Farbstoffkonjugate, in denen der Farbstoff $-(F)_n$ der allgemeinen Formel I ein Cyaninfarbstoff der allgemeinen Formel II



15

ist, in der

D für einen Rest III oder IV

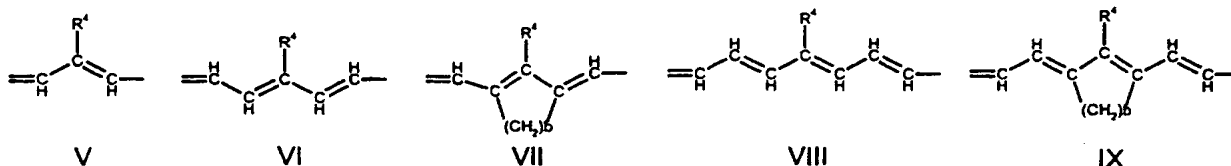


20

steht, wobei die mit einem Stern markierte Position die Verknüpfungsstelle mit dem Rest B bedeutet, und

B für die Gruppe V, VI, VII, VIII oder IX

25



stehen kann, in denen

- 5 R^1 und R^2 C_1 - C_4 -Sulfoalkyl, eine gesättigte oder ungesättigte, verzweigte oder lineare C_1 - C_{50} -Alkylkette bedeutet, die gegebenenfalls mit bis zu 15 Sauerstoffatomen, und/oder mit bis zu 3 Carbonylgruppen, und/oder mit bis zu 5 Hydroxygruppen substituiert sein kann,
- R^3 für die Gruppe $-COOE^1$, $-CONE^1E^2$, $-NHCOE^1$, $-NHCONHE^1$, $-NE^1E^2$, $-OE^1$, $-OSO_3E^1$, $-SO_3E^1$, $-SO_2NHE^1$ oder $-E^1$ steht, wobei
- 10 E^1 und E^2 unabhängig voneinander für ein Wasserstoffatom, C_1 - C_4 -Sulfoalkyl, gesättigtes oder ungesättigtes, verzweigtes oder geradkettiges C_1 - C_{50} -Alkyl steht, das gegebenenfalls mit bis zu 15 Sauerstoffatomen, und/oder bis zu 3 Carbonylgruppen unterbrochen, und/oder mit bis zu 5 Hydroxygruppen substituiert sein kann,
- 15 R^4 für ein Wasserstoffatom oder ein Fluor- Chlor, Brom- oder Iodatom steht,
- b für 2 oder 3 steht,
- X für Sauerstoff, Schwefel oder die Gruppe $=C(CH_3)_2$ oder $-(CH=CH)-$ steht,
- 20 und
- L für eine direkte Bindung oder einen Linker, der eine geradkettige oder verzweigte Kohlenstoffkette mit bis zu 20 Kohlenstoffatomen, welche mit einer oder mehreren $-OH$, $-COOH$, SO_3 -Gruppen substituiert, und/ oder gegebenenfalls ein oder mehrfach durch eine $-O-$, $-S-$, $-CO-$, $-CS-$, $-CONH-$, $-NHCO-$, $-NHCSNH-$, $-SO_2-$, PO_4^{--} oder eine $-NH$ -Gruppen oder einen Arylring unterbrochen sein kann, steht.
- 25

Die erfindungsgemäßen Antikörper-Farbstoffkonjugate können entweder alleine oder in Formulierung als Arzneimittel zur Anwendung kommen.

- Zur Verwendung der Antikörper-Farbstoffkonjugate als Arzneimittel werden
- 5 diese in die Form eines pharmazeutischen Präparats gebracht, das neben dem Antikörper-Farbstoffkonjugat für die enterale oder parenterale Applikation geeignete pharmazeutische, organische oder anorganische inerte Trägermaterialien, wie zum Beispiel, Wasser, Gelatine, Gummi arabicum, Milchzucker, Stärke, Magnesiumstearat, Talk, pflanzliche Öle,
- 10 Polyalkylenglykole usw. enthält. Die pharmazeutischen Präparate können in fester Form, zum Beispiel als Tabletten, Dragees, Suppositorien, Kapseln oder in flüssiger Form, zum Beispiel als Lösungen, Suspensionen oder Emulsionen vorliegen. Gegebenenfalls enthalten sie darüber hinaus Hilfsstoffe wie Konservierungsmittel, Stabilisierungsmittel, Netzmittel oder Emulgatoren, Salze
- 15 zur Veränderung des osmotischen Drucks oder Puffer.

Für die parenterale Anwendung sind Injektionslösungen oder Suspensionen, insbesondere wässrige Lösungen der Antikörper-Farbstoffkonjugate geeignet.

- 20 Als Trägersysteme können auch grenzflächenaktive Hilfsstoffe wie Salze der Gallensäuren oder tierische oder pflanzliche Phospholipide, aber auch Mischungen davon sowie Liposome oder deren Bestandteile verwendet werden. Für die orale Anwendung sind insbesondere Tabletten, Dragees oder Kapseln mit Talkum und/oder Kohlenwasserstoffträger oder -binder, wie zum Beispiel
- 25 Lactose, Mais- oder Kartoffelstärke, geeignet. Die Anwendung kann auch in flüssiger Form erfolgen, wie zum Beispiel als Saft, dem gegebenenfalls ein Süßstoff beigelegt ist.

- Die Dosierung der Antikörper-Farbstoffkonjugate kann je nach Verabfolgungsweg, Alter und Gewicht des Patienten, Art und Schwere der zu
- 30 behandelnden Erkrankung und ähnlichen Faktoren variieren. Die anwendbare Dosis der Antikörper-Farbstoffkonjugate zur Erkennung der Grenzbereiche beträgt 0,5-1000 mg, vorzugsweise 50-200 mg, wobei die Dosis als einmal zu

-12-

verabreichende Einzeldosis oder unterteilt in 2 oder mehreren Tagesdosen gegeben werden kann.

Die oben beschriebenen Formulierungen und Darreichungsformen sind ebenfalls
5 Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Somit betrifft die Erfindung auch pharmazeutische Mittel, die ein oder mehrere
Antikörper-Farbstoffkonjugate umfassen, zur intraoperativen Darstellung der
Randbereiche eines Krankheitsherd, wobei die pharmazeutischen Mittel
entweder alleine oder in Mischung mit geeigneten Lösungsmitteln, Puffern und/
10 oder Trägerstoffen zur Anwendung kommen.

Die erfindungsgemäßen Antikörper-Farbstoffkonjugate kommen bei der
chirurgischen Behandlung von angiogeneseabhängigen Erkrankungen, wie
malignen Tumoren und deren Metastasen, benignen Tumoren, präkanzeröse
15 Gewebsveränderungen, Endometriose, Hämangiomen, extrauterinen
Schwangerschaften zum Einsatz.

Ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der
Antikörper-Farbstoffkonjugate und Mittel zur intraoperativen Darstellung von
20 Krankheitsherden, insbesondere zur mikro- und makroskopischen,
intraoperativen Darstellung der Randbereiche eines Krankheitsherd, sowie die
Verwendung der Antikörper-Farbstoffkonjugate zur Herstellung eines Mittels für
chirurgische Behandlungen von angiogeneseabhängigen Erkrankungen, wie
malignen Tumoren und deren Metastasen, benignen Tumoren, präkanzeröse
25 Gewebsveränderungen, Endometriose, Hämangiomen und extrauterinen
Schwangerschaften.

Herstellung der Farbstoffe

30

Die Herstellung der Farbstoffe erfolgt nach literaturbekannten Methoden.
Geeignete Farbstoffe für die Herstellung der Antikörper-Farbstoffkonjugate sind
Farbstoffe Carboxylgruppen oder Isothiocyanatgruppen zur kovalenten

Kopplung an Aminogruppen des Antikörpers. Besonders bevorzugt sind hierbei Cyaninfarbstoffe (Mujumdar SR et al. (1996) 7: 356-362; Flanagan JH et al. (1997) 8: 751-756 und Licha K et al. (1996) Proc SPIE Vol 2927, 192-198).

- 5 Die Farbstoffe mit Carboxylgruppen werden zunächst durch Überführung in einen reaktiven Ester (z. B. N-Hydroxysuccinimidester) nach an sich bekannten Methoden aktiviert. Farbstoffe mit Isothiocyanatgruppen können direkt eingesetzt werden. Die reaktiven Derivate werden dann in Pufferlösung oder Gemischen aus organischem Lösungsmittel (z. B. Dimethylformamid (DMF)
10 oder Dimethylsulfoxid (DMSO)) und Pufferlösung mit dem Antikörper zur Reaktion gebracht. Dabei wird ein 3 bis 100-facher molarer Überschuß an Farbstoff verwendet. Der nicht reagierte Anteil wird nach beendeter Reaktion durch Ultrafiltration und/oder Chromatographie abgetrennt.
- 15 In analoger Verfahrensweise wird auch folgender Farbstoff hergestellt:

Herstellungsbeispiel 1

20

Bis-1,1'-(4-sulfobutyl)indocarbocyanin-5-carbonsäure-N-hydroxysuccinimidester

- Die Herstellung von Bis-1,1'-(4-sulfobutyl)indocarbocyanin-5-carbonsäure erfolgt ausgehend von 1-(4-Sulfobutyl)-2,3,3-trimethyl-3*H*-indolenin und 1-(4-
25 Sulfobutyl)-2,3,3-trimethyl-5-carboxy-3*H*-indolenin (Cytometry 10, 11-19, 1989, Talanta 39, 505-510, 1992) in Anlehnung an literaturbekannte Methoden. Zur Überführung in den N-Hydroxysuccinimidester wird 0,1 mmol Farbstoff (67 mg in 10 ml DMF) mit jeweils 0,5 mmol N-Hydroxysuccinimid und Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) versetzt und 24 h bei Raumtemperatur gerührt.
30 Nach Zugabe von 50 ml Ether wird der ausgefallene Feststoff abfiltriert, erneut je zweimal in wenig DDF gelöst und mit Ether gefällt und schließlich im Vakuum getrocknet (Ausbeute 89%).

35

Herstellung des Antikörper-Farbstoffkonjugats

Herstellung eines Bis-1,1'-(4-sulfobutyl)indocarbocyanin-Konjugates mit L19-

5 Antikörper

Der Antikörper L19 (1 mg in 1 ml Natriumacetat-Puffer 50 mM, pH 8,2)) wird mit N-Hydroxysuccinimidester (75 µmol einer Lösung von 4 mg/ml in DMSO) versetzt und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Aufreinigung erfolgt mittels Gelfiltration über PD10-Kartuschen (Pharmacia) und Aufkonzentration mittels Centricon-10 tubes (Amicon) unter Erhalt einer Lösung von ca. 1 mg/ml Antikörper.

Absorptionsmaximum: 555 nm

Fluoreszenzmaximum: 582 nm.

15

Das nachfolgenden Beispiel erläutern die biologische Anwendbarkeit der erfindungsgemäßen Antikörper-Farbstoffkonjugate ohne diese auf die Anwendungsbeispiele zu beschränken.

5 Anwendungsbeispiel 1

In-vivo-Fluoreszenzbildgebung an tumortragenden Nacktmäusen und mikroskopische Ex-vivo-Untersuchung des Tumorgewebes

- 10 Die bildgebenden Eigenschaften der erfindungsgemäßen Verbindungen wurden in vivo nach Injektion in tumortragenden Nacktmäusen untersucht. Dazu wird 0,1 $\mu\text{mol/kg}$ bis 2 $\mu\text{mol/kg}$ der Substanz intravenös appliziert und die Anreicherung in der Tumorregion in einem Zeitraum von 0 bis 48 Stunden beobachtet. Die Fluoreszenz der Substanzen wird durch Bestrahlung der Tiere
- 15 mit Licht entsprechender Wellenlänge, das mit einem Laser (Diodenlaser, Festkörperlaser) monochromatisch erzeugt wird oder durch Filter aus der polychromatischen Emission einer Hg- oder Xe-Lampe herausgefiltert wird, induziert. Im Fall der im Herstellungsbeispiel 1 beschriebenen Verbindung wird aus einem Nd:YAG Laser Licht der Wellenlänge 540 nm zur Anregung zur
- 20 Ausleuchtung des Versuchstieres verwendet und die Fluoreszenzstrahlung bei einer Wellenlänge von >580 nm durch eine intensivierte CCD-Kamera unter Erhalt von Ganzkörperfluoreszenzaufnahmen detektiert. Parallel wird die Fluoreszenz visuell und photographisch erfasst. Aus dem Tumormaterial werden Schnitte angefertigt und mikroskopisch untersucht (Zeiss Axiovert Mikroskop mit
- 25 Cy3-Filtersatz).
- Nach Injektion von 1 $\mu\text{mol/kg}$ des im Herstellungsbeispiel genannten Antikörper-Farbstoffkonjugates in F9-Teratokarzinomtragenden Nacktmäusen konnte nach 4 h ein erhöhtes Fluoreszenzsignal im Vergleich zu Normalgewebe anhand von Ganzkörperfluoreszenzaufnahmen detektiert werden.
- 30 Nach Präparation der Haut und der obersten Gewebeschichten des Tumors kann die Fluoreszenz den Randbereichen des Tumors zugeordnet werden. Die mikroskopische Beurteilung von Tumorschnitten ergibt eine erhöhte Fluoreszenz, die mit Blutgefäßen des Tumorrandbereiches korreliert.

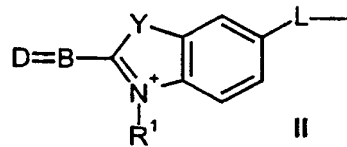
Patentansprüche

1. Antikörper-Farbstoffkonjugate, dadurch gekennzeichnet, daß sie sich im
Randbereich des Zellgewebes eines Krankheitsherdes bevorzugt
5 anreichern und damit den Randbereich des Krankheitsherdes optisch
darstellbar machen.
2. Antikörper-Farbstoffkonjugate gemäß Anspruch 1, der allgemeinen
Formel I
- 10
$$B-(F)_n \quad (I),$$

in der
B für einen Antikörper oder ein Antikörperfragment mit hoher
Bindung an EDB-Fibronektin steht,
- 15 F für einen Farbstoff aus der Klasse der Coumarine, der
Fluoresceine, Carboxyfluoresceine, der Difluorofluoresceine, der
Tetrabromfluoresceine, der Tetraiodfluoresceine, der Rhodamine,
der Carboxyrhodamine, der Carboxyrhodole, der 4,4-Difluoro-4-
bora-3a,4a-diaza-indacene, der Polymethinfarbstoffe oder der
20 Tetrapyrrolfarbstoffe, oder der Terbium- oder Europiumkomplexe
mit DTPA oder Cyclen und dessen Derivaten steht
und
n für 1 bis 5 steht, bedeuten.
- 25 3. Antikörper-Farbstoffkonjugate gemäß den Ansprüchen 1 und 2, dadurch
gekennzeichnet, daß der Farbstoff ein Cyaninfarbstoff, ein
Merocyaninfarbstoff, ein Oxonolfarbstoff, ein Styrylfarbstoff oder ein
Squariliumfarbstoff ist.
- 30 4. Antikörper-Farbstoffkonjugate gemäß den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch
gekennzeichnet, daß der Farbstoff ein Cyaninfarbstoff wie Carbocyanin,
Dicarbocyanin oder Tricarbocyanin ist.

5. Antikörper-Farbstoffkonjugate gemäß den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Farbstoff $-(F)_n$ der allgemeinen Formel I ein Cyaninfarbstoff der allgemeinen Formel II

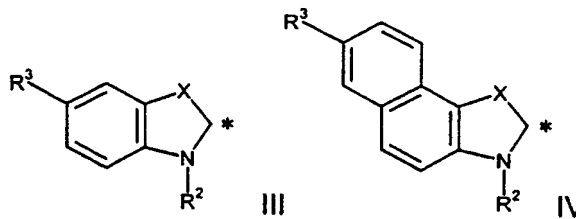
5



ist, in der

D

für einen Rest III oder IV



10

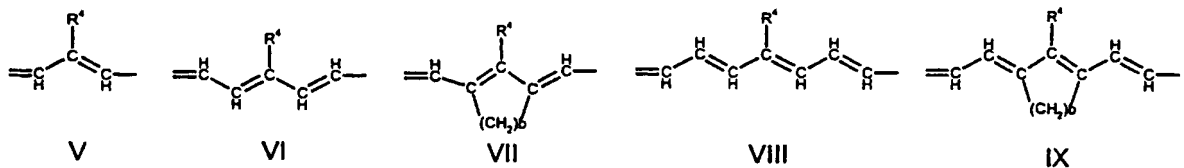
steht, wobei die mit einem Stern markierte Position die Verknüpfungsstelle mit dem

Rest B bedeutet, und

B

für die Gruppe V, VI, VII, VIII oder IX

15



stehen kann, in denen

R^1 und R^2

C_1 - C_4 -Sulfoalkyl, eine gesättigte oder ungesättigte, verzweigte oder lineare C_1 - C_{50} -Alkylkette bedeutet, die gegebenenfalls mit bis zu 15 Sauerstoffatomen, und/oder mit bis zu 3 Carbonylgruppen, und/oder mit bis zu 5 Hydroxygruppen substituiert sein kann,

20

-18-

- R^3 für die Gruppe $-\text{COOE}^1$, $-\text{CONE}^1\text{E}^2$, $-\text{NHCOE}^1$,
 $-\text{NHCONHE}^1$, $-\text{NE}^1\text{E}^2$, $-\text{OE}^1$, $-\text{OSO}_3\text{E}^1$, $-\text{SO}_3\text{E}^1$, $-\text{SO}_2\text{NHE}^1$
oder $-\text{E}^1$ steht,
wobei
- 5 E^1 und E^2 unabhängig voneinander für ein Wasserstoffatom, C_1 - C_4 -
Sulfoalkyl, gesättigtes oder ungesättigtes, verzweigtes oder
geradkettiges C_1 - C_{50} -Alkyl steht, das gegebenenfalls mit bis zu
15 Sauerstoffatomen, und/oder bis zu 3 Carbonylgruppen
unterbrochen, und/oder mit bis zu 5 Hydroxygruppen
10 substituiert sein kann,
- R^4 für ein Wasserstoffatom oder ein Fluor-, Chlor-, Brom- oder
Iodatom steht,
- b für 2 oder 3 steht,
- X für Sauerstoff, Schwefel oder die Gruppe $=\text{C}(\text{CH}_3)_2$ oder
15 $-(\text{CH}=\text{CH})-$ steht,
und
- L für eine direkte Bindung oder einen Linker, der eine
geradkettige oder verzweigte Kohlenstoffkette mit bis zu 20
Kohlenstoffatomen, welche mit einer oder mehreren $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, SO_3 -Gruppen substituiert, und/ oder gegebenenfalls
20 ein oder mehrfach durch eine $-\text{O}-$, $-\text{S}-$, $-\text{CO}-$, $-\text{CS}-$, $-\text{CONH}-$,
 $-\text{NHCO}-$, $-\text{NHCSNH}-$, $-\text{SO}_2-$, PO_4^- oder eine $-\text{NH}$ -Gruppen
oder einen Arylring unterbrochen sein kann, steht.
- 25 6. Antikörper-Farbstoffkonjugate gemäß den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch
gekennzeichnet, daß als Antikörper die Antikörper L19 und E8 verwendet
werden.
7. ~~Antikörper-Farbstoffkonjugate gemäß den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch~~
30 gekennzeichnet, daß der Farbstoff im sichtbaren Spektralbereich des
Lichtes ein optisches Signal induziert.

-19-

8. Antikörper-Farbstoffkonjugate gemäß den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Farbstoff erst unter Verwendung eines definierten Wellenlängenbereiches des sichtbaren oder nahinfraroten Lichtes ein Fluoreszenzsignal induziert.
- 5
9. Pharmazeutisches Mittel, umfassend ein oder mehrere Antikörper-Farbstoffkonjugate gemäß den Ansprüchen 1 bis 8, zur intraoperativen Darstellung der Randbereiche eines Krankheitsherd.
- 10
10. Pharmazeutisches Mittel gemäß Anspruch 9, in Mischung mit geeigneten Lösungsmitteln, Puffern und/ oder Trägerstoffen.
11. Verwendung der Antikörper-Farbstoffkonjugate und Mittel gemäß den Ansprüchen 1 bis 10 zur intraoperative Darstellung von
- 15
12. Verwendung der Antikörper-Farbstoffkonjugate gemäß den Ansprüchen 1 bis 10 zur intraoperativen Darstellung der Randbereiche eines Krankheitsherd.
- 20
13. Verwendung der Antikörper-Farbstoffkonjugate gemäß den Ansprüchen 1 bis 10 zur mikro- und makroskopischen, intraoperative Darstellung der Randbereiche eines Krankheitsherd.
- 25
14. Verwendung der Antikörper-Farbstoffkonjugate gemäß den Ansprüchen 1 bis 8 zur Herstellung eines Mittels zur chirurgischen Behandlung von angiogeneseabhängigen Erkrankungen, wie malignen Tumoren und deren Metastasen, benignen Tumoren, präkanzeröse Gewebsveränderungen, Endometriose, Hämangiomen und extrauterinen Schwangerschaften.
- 30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 00/08121

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K49/00 //C07K16/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, MEDLINE, WPI Data, EPO-Internal, PAJ, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| X | NERI DARIO ET AL: "Targeting by affinity-matured recombinant antibody fragments of an angiogenesis associated fibronectin isoform." NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 15, no. 12, 1997, pages 1271-1275, XP002124779 ISSN: 1087-0156 cited in the application | 1-10 |
| Y | abstract page 1271, column 2, paragraph 2 -page 1273, column 1, paragraph 5 page 1273, column 2, paragraph 4 -page 1274, paragraph 1 page 1274, column 2, last paragraph -page 1275, column 1, paragraph 1 -/- | 11-14 |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 November 2000

Date of mailing of the international search report

22/11/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Muller-Thomalla, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 00/08121

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| X | VITI F ET AL: "Increased binding affinity and valence of recombinant antibody fragments lead to improved targeting of tumoral angiogenesis." CANCER RESEARCH, (1999 JAN 15) 59 (2) 347-52. , XP002124782 cited in the application | 1-10 |
| Y | abstract figure 4 page 351, column 1, last paragraph -column 2, paragraph 1 | 11-14 |
| X | MARIANI G ET AL: "Tumor targeting potential of the monoclonal antibody BC-1 against oncofetal fibronectin in nude mice bearing human tumor implants." CANCER, (1997 DEC 15) 80 (12 SUPPL) 2378-84. , XP000960444 | 1-10 |
| Y | page 2378, column 2, line 1 -page 2379, column 1, paragraph 4 page 2379, column 2, last paragraph -page 2380, column 1, paragraph 1 page 2381, column 1, last paragraph -page 2383, column 1, paragraph 1 | 11-14 |
| X | CASTELLANI P ET AL: "The fibronectin isoform containing the ED-B oncofetal domain: a marker of angiogenesis 'published erratum appears in Int J Cancer 1995 Jul 4;62(1):118!.' INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, (1994 DEC 1) 59 (5) 612-8. , XP000960445 | 1-10 |
| Y | page 612, column 2, paragraph 3 page 614, column 1, paragraph 2 -column 2, paragraph 1 page 616, column 1, paragraph 3 -column 2, paragraph 2 | 11-14 |
| Y | POON ET AL: "Laser-induced fluorescence: experimental intraoperative delineation of tumor resection margins" STN CAPLUS,XX,XX, vol. 25, no. 116, 22 June 1992 (1992-06-22), XP002076252 abstract | 11-14 |
| Y | US 4 341 223 A (LUTZ LAURALEE A) 27 July 1982 (1982-07-27) column 1, line 1 -column 2, line 66 claims 5-13 | 11-14 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/08121

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| US 4341223 A | 27-07-1982 | NONE | |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/08121

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 A61K49/00 //C07K16/18

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS, MEDLINE, WPI Data, EPO-Internal, PAJ, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| X | NERI DARIO ET AL: "Targeting by affinity-matured recombinant antibody fragments of an angiogenesis associated fibronectin isoform." NATURE BIOTECHNOLOGY, Bd. 15, Nr. 12, 1997, Seiten 1271-1275, XP002124779 ISSN: 1087-0156 in der Anmeldung erwähnt | 1-10 |
| Y | Zusammenfassung Seite 1271, Spalte 2, Absatz 2 -Seite 1273, Spalte 1, Absatz 5 Seite 1273, Spalte 2, Absatz 4 -Seite 1274, Absatz 1 Seite 1274, Spalte 2, letzter Absatz -Seite 1275, Spalte 1, Absatz 1 -/- | 11-14 |



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahellegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

13. November 2000

Abschließdatum des internationalen Recherchenberichts

22/11/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Muller-Thomalla, K

| C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN | | |
|--|--|--------------------|
| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
| X | VITI F ET AL: "Increased binding affinity and valence of recombinant antibody fragments lead to improved targeting of tumoral angiogenesis." CANCER RESEARCH, (1999 JAN 15) 59 (2) 347-52. , XP002124782 | 1-10 |
| Y | in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Abbildung 4 Seite 351, Spalte 1, letzter Absatz -Spalte 2, Absatz 1 | 11-14 |
| X | MARIANI G ET AL: "Tumor targeting potential of the monoclonal antibody BC-1 against oncofetal fibronectin in nude mice bearing human tumor implants." CANCER, (1997 DEC 15) 80 (12 SUPPL) 2378-84. , XP000960444 | 1-10 |
| Y | Seite 2378, Spalte 2, Zeile 1 -Seite 2379, Spalte 1, Absatz 4 Seite 2379, Spalte 2, letzter Absatz -Seite 2380, Spalte 1, Absatz 1 Seite 2381, Spalte 1, letzter Absatz -Seite 2383, Spalte 1, Absatz 1 | 11-14 |
| X | CASTELLANI P ET AL: "The fibronectin isoform containing the ED-B oncofetal domain: a marker of angiogenesis 'published erratum appears in Int J Cancer 1995 Jul 4;62(1):118!." INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, (1994 DEC 1) 59 (5) 612-8. , XP000960445 | 1-10 |
| Y | Seite 612, Spalte 2, Absatz 3 Seite 614, Spalte 1, Absatz 2 -Spalte 2, Absatz 1 Seite 616, Spalte 1, Absatz 3 -Spalte 2, Absatz 2 | 11-14 |
| Y | POON ET AL: "Laser-induced fluorescence: experimental intraoperative delineation of tumor resection margins" STN CAPLUS,XX,XX, Bd. 25, Nr. 116, 22. Juni 1992 (1992-06-22), XP002076252 Zusammenfassung | 11-14 |
| Y | US 4 341 223 A (LUTZ LAURALEE A) 27. Juli 1982 (1982-07-27) Spalte 1, Zeile 1 -Spalte 2, Zeile 66 Ansprüche 5-13 | 11-14 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/08121

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| US 4341223 A | 27-07-1982 | KEINE | |